

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-73592

(43)公開日 平成10年(1998) 3月17日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 2 1		G 0 1 N 33/543	5 2 1

審査請求 有 請求項の数13 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平9-209034  
(62)分割の表示 特願昭63-68000の分割  
(22)出願日 昭和63年(1988) 3月22日  
  
(31)優先権主張番号 3 1 0 2 3  
(32)優先日 1987年 3月27日  
(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 591007332  
ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン  
パニー  
BECTON DICKINSON AN  
D COMPANY  
アメリカ合衆国ニュージャージー州07417  
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・  
ベクトン・ドライブ (番地なし)  
(72)発明者 ロバート・ダブリュー・ローゼンステイン  
アメリカ合衆国メリーランド州21043, エ  
リコット・シティ, プライツ・ベイ・ウェ  
イ 4273  
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外4名)

(54)【発明の名称】 固相イムノアッセイ法

(57)【要約】

【課題】 被分析体を含む液体試料中に浸漬するだけで簡便に被分析体を検出できるアッセイ手段の提供。

【解決手段】 a) 同一平面上に存在し互いに毛管流により連絡可能である第1部分および第2部分を含む、トレーサーおよび結合剤を支持するための固体支持体である試験ストリップ;

b) その中に移動可能なように支持されたトレーサーを含む上記第1部分であって、ここで該トレーサーは被分析体に特異的な、小胞マーカを除く不溶性粒状マーカに結合したリガンドを含み、そして試料添加部位である上記第1部分;そして

c) その中に被分析体に特異的な固定化された結合剤を含む上記第2部分であって、ここで該結合剤は第2部分中で結合したトレーサーが可視化される量で存在し、そして上記粒状マーカの存否を可視的に検出する部位である上記第2部分;を含む、液体試料中の被分析体の存否を測定するためのアッセイ装置。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】a) 同一平面上に存在し互いに毛管流により連絡可能である第1部分および第2部分を含む、トレーサーおよび結合剤を支持するための固形支持体である試験ストリップ;

b) その中に移動可能なように支持されたトレーサーを含む上記第1部分であって、ここで該トレーサーは被分析体に特異的な、小胞マーカーを除く不溶性粒状マーカーに結合したリガンドを含み、そして試料添加部位である上記第1部分;そして

c) その中に被分析体に特異的な固定化された結合剤を含む上記第2部分であって、ここで該結合剤は第2部分中で結合したトレーサーが可視化される量で存在し、そして上記粒状マーカーの存否を可視的に検出する部位である上記第2部分;を含む、液体試料中の被分析体の存否を測定するためのアッセイ装置。

【請求項2】不溶性粒状マーカーが着色重合体ビーズ、金属、合金および重合染料粒子からなる群から選択される、請求項1記載の装置。

【請求項3】粒状マーカーが着色重合体ビーズである、請求項2記載の装置。

【請求項4】被分析体が抗原であり、かつ上記リガンドおよび結合剤がその抗体である、請求項1記載の装置。

【請求項5】上記リガンドおよび結合剤が抗原またはその類似物であり、かつ被分析体がその抗体である、請求項1記載の装置。

【請求項6】上記結合剤がリガンドに特異的である、請求項1記載の装置。

【請求項7】上記第1部分と第2部分と同一平面上に第3部分を含み、上記すべての部分が互いに毛管流により連絡可能である、請求項6記載の装置。

【請求項8】検出可能な粒状マーカーが着色重合体ビーズ、金属、合金および重合染料粒子からなる群から選択される、請求項6記載の装置。

【請求項9】粒状マーカーが着色重合体ビーズである、請求項6記載の装置。

【請求項10】ビーズがポリスチレンビーズである、請求項9記載の装置。

【請求項11】被分析体が抗原である、請求項9記載の装置。

【請求項12】被分析体が抗体である、請求項6記載の装置。

【請求項13】a) 請求項1記載の装置の第1部分に液体試料を添加し;

b) 上記液体試料がトレーサーと混合されるのに十分であり、かつ、該トレーサー-被分析体混合物が請求項1記載の装置の第2部分に流れるのに十分な時間放置し;そして

c) 上記第2部分中の上記小胞マーカーを除く粒状マーカーの存否を可視的に測定することにより結果を読み取

る、工程からなる、液体試料中の被分析体の存否を測定する一段階法。

**【発明の詳細な説明】**

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は被分析体のアッセイ法、より詳細には固相アッセイ法に関する。

【0002】

【従来の技術】各種の被分析体のアッセイがいわゆる固相アッセイ法により行われている。固相アッセイ法においては、少なくとも測定すべきリガンド(被分析体)に特異的な結合剤を固形支持体に支持させる。このためこのアッセイ法ではアッセイに際して形成された結合相と遊離相を分離するために付加的な試薬を用いる必要がない。

【0003】一般にこの種の固形支持体はチューブ、固体粒子、などの形状であり、場合により固相は“ディップスティック(bip-stick)”の形状のものであった。

【0004】ディップスティック固相アッセイ法の場合、結合剤はディップスティックに支持されており、この結合剤を含むディップスティックが被分析体を含有するアッセイ液に浸漬される。一般にこの種の溶液はさらにトレーサーを含有する。その場合、ディップスティック上のトレーサーの存在および/または量の被分析体の尺度として用いられる(被分析体の質的または量的尺度)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は被分析体を測定するための改良された固相アッセイ法の提供、より詳細には固相アッセイ法を目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の一観点によれば、第1部分および第2部分を備え、第1部分と第2部分は相互に毛管流により連絡しており、これにより物質が毛管現象によって流動する固形支持体が提供される。これらの第1および第2部分は、第1部分が被分析体を含む材料と接触し、この第1部分の材料が支持体の第1部分からその第2部分へ毛管現象により輸送される状態で固形支持体上に配置される。

【0007】固形支持体の第2部分には結合剤が含まれる。これは少なくとも被分析体の結合剤であり、アッセイ形式がいわゆる競合アッセイ形式である場合はアッセイに用いられるトレーサーの結合剤でもある。

【0008】固形支持体にはトレーサーも含まれる。これはリガンド部分、およびトレーサーのリガンド部分に結合した検出可能なラベル部分からなる。アッセイ形式がいわゆる競合アッセイ形式である場合、トレーサーのリガンド部分に固形支持体の第2部分に含まれる結合剤が結合する。アッセイ形式いわゆるサンドイッチアッセイ形式である場合、トレーサーのリガンド部分に被分析

体が結合する。

【0009】トレーサーは固形支持体のトレーサー部分において、以下の様式で固形支持体に支持される。すなわち湿潤するとトレーサーは毛管現象によって固形支持体の第2部分へ輸送され、次いで被分析体の存在および／または不在および／または被分析体量に応じて、のちにより詳細に説明するように固形支持体の第3部分へ輸送されうる様式で支持される。

【0010】固形支持体のトレーサー部分は固形支持体の別個の部分であってもよく、固形支持体の第1部分（試料が添加される部分）であってもよい。

【0011】固相の第2部分に支持される結合剤は、結合剤が固定化された状態を保ち、毛管現象によって固形支持体の第3部分へ輸送されることのない様式で支持されている。

【0012】固形支持体の第3部分は毛管現象によって第2部分から第3部分へ輸送されたトレーサーを検出するための部分である。第3部分にはトレーサーを検出するための物質が支持されていてもよく、支持されていなくてもよい。あるいは第3部分は第2部分に結合しなかった材料を受容する機能をもつのみでもよい。

【0013】本発明によれば、第2部分の結合剤に直接に結合することにより（競合アッセイ形式の場合）、または結合剤に間接的に結合することにより（サンドイッチアッセイ形式の場合、トレーサーは結合剤に結合した被分析体に結合する）固形支持体の第2部分に固定化されたトレーサーの量は、試料中の被分析体の存在および／または量に依存する。いわゆるサンドイッチアッセイ形式の場合、固形支持体の第2部分から第3部分へ毛管現象により送られるトレーサーの量は試料中の被分析体の量に反比例する。またいわゆる競合アッセイ形式の場合、固形支持体の第2部分から第3部分へ毛管現象により送られるトレーサーの量は試料中の被分析体の量に正比例する。

【0014】本発明の好ましい形態においては、固形支持体および各種成分は被分析体を競合アッセイ形式により測定する様式で調製および使用され、トレーサーは固形支持体の第1部分に支持されている。

【0015】特に好ましい形態においては、のちにより詳細に説明するようにトレーサーの検出可能な標識部分は検出可能な標識を含むサック（sack）、または脂質小胞（しばしばリポソームと呼ばれる）からなる。

【0016】アッセイ法が競合アッセイ法である好ましい形態を採用する場合、トレーサーは固形支持体の第1部分に支持され、固形支持体の第1部分は測定すべき被分析体を含有する試料で湿潤される。固形支持体を試料で湿潤させると、試料およびトレーサーが双方とも毛管現象によって固形支持体の第2部分へ流入する。ここには被分析体およびトレーサーの双方に特異的な結合剤が含まれており、この結合剤は固形支持体の第2部分に固

定化されている。試料部分の被分析体の存在および／または量に応じて、トレーサーは固形支持体の第2部分にある結合剤に結合する。第2部分の結合剤に結合しなかったトレーサーは次いで固形支持体の第3部分へ毛管現象により流入し、そこで検出および／または測定される。アッセイ形式が単純な“有”または“無”の形式である場合（試料中の被分析体の存否のみを判定する）、固形支持体の第2部分に支持される結合剤は、試料中に検出可能な量の被分析体が存在しない場合には固形支持体の第3部分に検出可能なトレーサーが存在しない状態になる量で支持されている。明らかに、試料中の被分析体の量が増加するのに伴って固形支持体の第2部分にある結合剤に結合しないトレーサーの量は増加し、これにより固形支持体の第3部分に存在するトレーサーの量は増加する。従って、固形支持体の第2部分に残留するトレーサーおよび／または毛管現象によって固形支持体の第3部分へ流入するトレーサーを測定し、この第2および／または第3部分において検出されたトレーサーの量を“標準曲線”と比較し、試料中の被分析体の量を測定することによって、定量的アッセイを行うことができる。従ってアッセイに際しトレーサーおよび／または被分析体の測定は定性的または定量的いずれも可能である。

【0017】サンドイッチアッセイ形式の場合、トレーサーは固形支持体の第1部分と異なる、固形支持体のトレーサー部分に支持されることが好ましい。トレーサーのリガンド部分に被分析体が結合し、固形支持体の第2部分にある結合剤は被分析体に特異的である。固形支持体の第1部分に試料を含有する被分析体を接触させ、固形支持体のトレーサー部分を湿潤させ、トレーサーおよび被分析体の双方を支持体の第2部分に支持された結合剤へ毛管現象によって流動させる。被分析体に結合したトレーサーの量は試料中の被分析体の量に正比例し、被分析体に結合したトレーサーおよび結合していないトレーサーは毛管現象によって固形支持体の第2部分へ流入する。固形支持体の第2部分において被分析体は被分析体に特異的な固定化結合剤に結合する。結合していないトレーサー（固定化結合剤に結合した被分析体に結合していないトレーサー）は毛管現象によって固形支持体の第3部分へ流入する。固形支持体の第3部分にあるトレーサーを試料中の被分析体の存在および／または量の尺度として検出することができる。

【0018】“有”または“無”型のサンドイッチアッセイ形式の場合、固形支持体の第1部分に用いられるトレーサーの量、および固形支持体の第2部分にある結合剤の量は、検出可能な量の被分析体が存在する場合には本質的に検出可能な量のトレーサーが固形支持体の第3部分へ流入しないものである。

【0019】サンドイッチアッセイ形式の場合、固形支持体の第2部分に用いられる結合剤の量は、試料中に存

在すると思われる被分析体が本質的にすべて第2部分の結合剤に結合する量である。

【0020】アッセイに用いられる固形支持体は試料から被分析体を吸収することができ、かつ湿潤した際被分析体およびトレーサーを毛管作用によって固形支持体の第1部分から第2部分を通して第3部分へ流動させることができるものである。さらに固形支持体はトレーサーおよび結合剤を支持しうるものである。適切な固形支持体の代表例としてはガラス繊維、セルロース、ナイロン、架橋デキストラン、各種のクロマトグラフィー用紙、ニトロセルロースなどが挙げられる。特に好ましい材料はニトロセルロースである。

【0021】固形支持体は好ましくはストリップの形状をもち、第2および第3部分はストリップの同一平面上に、物質が毛管作用により第1帯域から第2帯域を通して第3帯域へ流入しうる様式で配列されている。好ましい形状はストリップ状であるが、その形状および形式が前記の各種機能を実施する別個の部分を作成しうる限り、他の多種多様な形状または形式のいずれをも採用しうる。

【0022】前記のアッセイに用いられるトレーサーはリガンド部分、およびこのリガンド部分に結合した検出可能な標識部分からなる。検出可能な標識部分の検出可能な標識は多種多様な検出可能な標識のいずれであってもよいが、本発明の好ましい形態においては検出可能な標識は固形支持体の第2および／または第3部分において色の変化を生じるものであり、これは可視的な色の変化であるか、または色の変化を検出するのに計測器を必要とするものである。好ましい形態によれば、用いられる標識は固形支持体の第2および／または第3部分において、計測器を用いずに見ることができる色の変化を生じる。たとえばこの色の変化は、検出可能な標識として酵素を用い、固形支持体の第3部分にこの酵素の基質を施し、この基質が酵素と接触した際に可視的な検出可能な色の変化を生じることにより得られる。あるいは、検出可能な標識が基質であり、固形支持体の第3部分にその酵素が施され、これにより第3部分において酵素が基質標識と接触することによって検出可能な色の変化が生じるものであってもよい。他の検出可能な標識の代表例（色の変化を検出するために計測器を必要としてもよく、必要としなくてもよい）としては、各種の色原体、たとえば蛍光性物質、吸収性色素などが挙げられる。以下に競合アッセイ法に示されるように、好ましい標識部分は検出可能なマーカを含む小胞であり、検出可能なマーカは可視である。

【0023】トレーサーのリガンド部分はアッセイ形式に依存する。アッセイが競合アッセイである場合、トレーサーのリガンド部分は被分析体またはその適宜な同族体である。適宜な同族体とは、そのリガンドの同族体にも被分析体の結合剤が特異的に結合することを意味す

る。アッセイ形式がサンドイッチ型のアッセイである場合、トレーサーのリガンド部分は被分析体または抗体（被分析体がこれに特異的に結合する）が特異的に結合するリガンドである。

【0024】アッセイに用いられる結合剤は少なくとも被分析体に結合するものである。前記のようにアッセイ形式が競合型のアッセイ形式である場合、結合剤はトレーサーのリガンド部分にも結合する。

【0025】当技術分野で一般に知られているように、被分析体が抗原またはハプテンである場合には結合剤は天然の結合剤または被分析体に特異的な抗体（多クローン抗体および／または単クローン抗体）のいずれであってもよい。被分析体が抗体である場合には、結合剤はその抗体に特異的な抗原、またはその被分析抗体に特異的に結合する抗体のいずれであってもよい。

【0026】結合剤は結合剤を固定化する様式、たとえば吸着、共有結合などにより固形支持体に支持させることができる。結合剤を固形支持体に固定化する方法は当技術分野で一般に知られている。

【0027】固形支持体の第1部分に支持されるトレーサーは、第1部分が湿潤した場合、トレーサーが毛管作用により流動する様式で支持される。たとえばトレーサーは支持体の第1部分に吸収されていてもよい。

【0028】本発明の特に好ましい形態によれば、競合アッセイ法の場合、トレーサーは小胞に結合したリガンドからなり、この小胞は検出可能なマーカを含み、トレーサーは固形支持体に支持されている。本発明者はこの種のトレーサーを前記の種類の固形支持体に支持させるのが可能であること、この種のトレーサーは固形支持体が被分析体を含むかまたは含有すると推定される試料で湿潤した場合に毛管現象によって流動することを見出した。

【0029】使用される脂質小胞（リボソーム）は多種多様な脂質から調製することができ、これにはリン脂質、糖脂質が含まれ、代表例としてはレシチン、スフィンゴミエリン、ジパルミトイルレシチン、ジステアロイルホスファチジルコリンなどが挙げられる。リボソームを調製するために用いられる両親媒性脂質は一般に親水基、たとえばホスファト基、カルボキシル基、スルファト基またはアミノ基、ならびに疎水基、たとえば飽和および不飽和脂肪族炭化水素残基、および1個または2個以上の芳香族または脂環式基により置換された脂肪族炭化水素残基を含む。リボソームを調製するための壁形成化合物にはさらにステロイド成分、たとえばコレステロール、コレスタノールなどが含まれる。リボソームを調製するための化合物は一般に当技術分野で知られており、本発明を完全に理解するためにこれに関してさらに詳述する必要はないと思われる。

【0030】リボソームは当技術分野で一般に用いられる方法により調製できる。たとえばリボソームを逆相蒸

発法により調製することができ、この場合リボソームを調製する際に用いられる化合物1種または2種以上をまず有機相に溶解し、次いで水相を添加し、均質なエマルジョンを形成させる。エマルジョンを調製したのち有機溶剤を蒸発させてゲル様物質となし、これを水性媒質中で攪拌または分散させることによってリボソームに変える。

【0031】リボソームの製法はたとえば米国特許第4,241,046号、第4,342,826号および国際特許出願公開w/o80-01515号明細書に記載されている。

【0032】ある物質をリボソームに封入したい場合、その物質をリボソームが形成される水溶液に含有させることによって、リボソームにその物質を封入させることができる。あるいは米国特許出願第659,200号明細書(1984年9月13日出願)に記載の方法により、あらかじめ形成された空のリボソーム(封入すべき物質を含まないもの)にその物質を封入することもできる。

【0033】リボソームは米国特許第4,522,803号明細書に記載の方法によっても調製することができる。

【0034】リボソーム内に閉込められ、または封入される物質(その物質はリボソームの水性コンパートメント内または二重膜内にある)は検出可能なマーカー、たとえば色素、放射性標識、蛍光物質、化学発光物質、電子スピン共鳴物質など;検出可能なマーカーの基質などである。あるいはリボソーム内にマーカーを封入するのではなく、リボソームを検出可能なマーカーで誘導体化することもできる。

【0035】リボソームはトレーサーを形成するためのリガンドで誘導体化される。当技術分野で知られている方法、たとえば共有結合、誘導体化または活性化などによりリボソームをリガンドで誘導体化することができる。リボソームをリガンドで誘導体化する場合、リボソームの形成に用いられる化合物1種または2種以上をリボソームの形成前にリガンドで誘導体化するか、またはリボソームの形成後にリボソームをリガンドで誘導体化することができる。リボソームをリガンドで誘導体化する方法、および誘導体化リボソームの調製に適したカップリング剤などは当技術分野で知られており、本発明を完全に理解するためにこれに関してさらに詳述する必要はないと思われる。

【0036】検出可能なマーカー部分が競合アッセイ法に用いるマーカーを含むリボソームからなる好ましいトレーサーを使用する場合、アッセイは各種トレーサー一般に関して先に述べたと同様に行われ、ただしトレーサーがトレーサーの検出可能なマーカー部分としてリボソームを含む。

【0037】特に好ましい形態においては、アッセイに

用いられるトレーサーは粒状の可視標識に結合したリガンドである。粒状標識は金属もしくは合金(たとえばコロイド状の金)またはサック、特に可視色素を含むリボソームである。好ましくはサックに含まれるマーカーはサックを溶解しなくても見える色素またはある種の他の物質である。

【0038】リガンドおよび粒状標識からなるトレーサーは、リガンドを疎水性色素もしくは顔料の、または色素もしくは顔料でコーティングしたポリマー核の水性分散液で標識することによっても調製される。この種の標識は米国特許第4,373,932号明細書(1983年2月15日発行)に、より詳細に記載されている。この特許に従って調製されたトレーサーも本発明におけるトレーサーとして用いられる。

【0039】上記特許明細書に示されるように、標識として用いられる着色有機化合物は疎水性ゾル状であり、この疎水性有機色素または顔料は水に不溶性であるか、またはごく限られた程度に可溶性であるにすぎない。

【0040】可視粒状標識は可視ポリマー粒子、たとえば好ましくは球状の着色ポリスチレン粒子であってもよい。

【0041】トレーサーが可視である本発明のアッセイ法に用いられるトレーサーの調製に使用できる他の粒状標識の代表例としては下記のものが挙げられる。フェリチン、フィコエリトリンその他のフィコビリ蛋白質;析出または不溶性金属または合金;菌類、藻類または細菌の色素または誘導体、たとえば細菌クロロフィル;植物材料または誘導体金属ゾルなど。この形態の場合、少なくとも結合剤を含む物品部分は、この部分に結合したトレーサーが可視である量の結合剤を支持しうる表面積をもつ材料から形成される。一般にこの表面積は少なくとも $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度、きわめて一般的には少なくとも $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度の結合剤を支持しうる。特に好ましい材料はニトロセルロースである。これらの材料およびトレーサーは米国特許出願第579,667号明細書(1984年2月14日出願)に記載されている。これをここに参考として引用する。

【0042】本発明をさらに添付の図面を参照しながら説明する。

【0043】図面は本発明によるディップスティックの略図である。

【0044】図面にはトレーサーが支持される第1部分A;結合剤が支持されている第2部分B;およびトレーサーが測定される可能性のある第3部分Dを含むストリップが示されている。特に示されるように、部分Cが部分BとDの間にあり、部分BとDの間に間隔を与えている。これによりトレーサー測定部分が結合剤を含む部分から一定距離分離している。

【0045】酵素を検出可能な標識として用いる競合アッセイ形式の場合、部分Aは酵素で標識されたリガンド

を含み、リガンド部分は被分析体またはその適宜な同族体である。部分Bは被分析体およびトレーサーのリガンド部分に特異的な結合剤を含み；部分Dは上記酵素と相互作用して色の変化を生じる、酵素基質を含むであろう。

【0046】使用する際には、ストリップ10の部分Aを被分析体が含まれる試料と接触させる。これにより部分Aは試料で湿潤するであろう。部分Aのトレーサーおよび試料は毛管現象により部分Bへ輸送され、ここでトレーサーと被分析体は結合剤上の結合部位に対し競合する。非結合トレーサーおよび非結合被分析体は毛管現象によって部分Cを通過して部分Dへ移動し、ここでトレーサーがある場合には部分Dの基質と相互作用して色の変化を生じる。前記のように、アッセイ法は“有-無”アッセイ法または定量的アッセイ法のいずれであってもよく、部分Dにおけるトレーサーの検出は採用するアッセイ法に依存する。

【0047】トレーサーがその検出のために付加的な物質を必要としない検出可能な標識を含む場合、部分Dは付加的な物質を必要としないであろう。すなわち部分Dもブランクであろう。たとえばトレーサーが検出可能な標識として色素を含むリボソームを含有する場合、トレーサーは部分Dに付加的な物質を支持させることなく測定できる。あるいはたとえば検出可能な標識をリボソームから放出する必要がある場合、部分Dは適切な溶解剤 (lysing agent)、たとえばリボソームを溶解する酵素または界面活性剤を含み、部分Dにおいてトレーサーの検出のためにリボソームから標識を放出させる。

【0048】さらに、トレーサーを部分Cにおいて測定することも可能であり、その際部分Dにおいてはトレーサーの測定を行うか、または行わない。たとえば標識が酵素である場合には、部分Cに基質を添加することができる。

【0049】上記物品はディップスティックとして使用することができる。あるいは試料を部分Aに施すこともできる。従って物品は水平または垂直いずれの向きでも使用できる。

【0050】本発明は多種多様な被分析体、たとえば下記のもの検出および／または測定するために利用できる。薬物；治療用薬物および乱用薬物を含む；ホルモン、ビタミン、蛋白質；あらゆる種類の抗体、ペプチドを含む；ステロイド；細菌；菌類；ウイルス；寄生虫；細菌、菌類、ウイルスまたは寄生虫の成分または産物；あらゆる種類のアレルゲン；正常細胞または悪性細胞の産物または成分など。たとえば特に $T_4$ ； $T_3$ ；ジゴキシ；HCG；インシュリン；テオフィリン；黄体形成ホルモン；各種疾患状態の原因となる、またはそれらに伴う生物、たとえば化膿性連鎖球菌 (*streptococcus pyogenes*) (A群)、単純ヘルペ

スIおよびII、サイトメガロウィルス、クラミジア属菌 (*chlamydiae*)、風疹抗体などが挙げられる。

#### 【0051】

【実施例】本発明をさらに以下の実施例により説明する。

【0052】[実施例] ポリスチレンの $0.5 \times 8$  cmのストリップにまずスコッチ (Scotch、登録商標) #969 接着剤転写テープ (スリーエム、ミネソタ州セントポール55144) を貼付することによりディップスティックを作成した。 $0.5 \times 0.5$  cmの正方形の細孔 $5 \mu\text{m}$  ニトロセルロース (エス・アンド・エス、ニューハンプシャー州キーン) からなる帯域Bにアフィニティ精製した家兎抗A群連鎖球菌抗原 $3 \mu\text{l}$  をスポットし、次いで3%ウシ血清アルブミンでブロックした。乾燥後、これをディップスティックのテープ貼付面に、スティックの下から約1 cmのところに施した。 $0.5 \times 6.5$  cmの濾紙ストリップ (ワットマン、3 mm) をニトロセルロースのすぐ上方に、これと接触させて施した (帯域CおよびDで示される位置)。次いで乾燥セファデックスG50 ファイングレード (ファルマシア) からなる帯域Aを施す。

【0053】スルホローダミン色素を充填した検出用リボソームはオコンネルら (クリニ、ケミ、(Clin. Chem.) 31:1424 [1985]) に概説された方法により調製された。これらをアフィニティ精製した家兎抗A群連鎖球菌抗原に共有結合させた。

【0054】検出用リボソームを下から $0.5$  cmの帯域Aにスポットし ( $2 \mu\text{l}$ )、風乾した。リボソームはグリセリン2%、ジメチルスルホキシド0.05%、EDTA 20 mMを含有する0.05 M トリス緩衝液 (pH 6.8) 中にある。

【0055】A群連鎖球菌は培養プレートから採取され、食塩液 (0.9% NaCl) で洗浄され、菌数 $1 \times 10^9$  個/ $\text{ml}$  に調整された。細菌 $1 \times 10^8$  個を含むアリコート ( $0.1 \text{ ml}$ ) をA群炭水化物抗原を露出させる微量亜硝酸抽出法で処理した。この方法は $0.1 \text{ M} \cdot \text{HCl}$   $0.3 \text{ ml}$  を $4 \text{ M} \cdot \text{NaNO}_2$   $40 \mu\text{l}$  と混合し、これを連鎖球菌に添加し、3分後に1 M トリス塩基 $40 \mu\text{l}$  で中和することによる。抽出およびディップスティック分析を容易にするためにHClおよび後続の希釈液は0.1% ツイーン-20 非イオン界面活性剤を含有する。

【0056】抽出された抗原を用いて菌数 $8 \times 10^6 \sim 1.25 \times 10^5$  個/ $\text{ml}$  の希釈系列を調製した。これら希釈液のアリコート ( $0.5 \text{ ml}$ ) を $12 \times 75 \text{ mm}$  の試験管に入れ、ディップスティックを各試験管内の液体に入れた。抽出された抗原を含有する液体がスティックに吸上げられるのに伴って、これは捕捉抗体のスポットを通して検出用リボソームを運搬する。抗原が存在す

ると、これが捕捉抗体スポットに結合し、若干のリボソームも結合し、その結果帯域Bに赤色のスポットが現われる。残りのリボソームおよび抗原溶液は通過して帯域Dへ入る。

【0057】アッセイ結果は帯域Bに赤色のスポットを生じた最小菌体濃度を観察することにより“読取る”ことができる。この例の結果を次表に示す。これは終末点  $5 \times 10^5$  個/mlであることを示す。これはA群ストレプトコッカス・ファリングチス (*Streptococcus pharyngitis*) の直接咽喉スワブ診断に必要な感度に近接する。

【0058】

【表1】

A群連鎖球菌抗原 (菌数/ml) $\times 10^{-5}$								
80	40	20	10	5	2.5	1.25	0	
+	+	+	+	+	-	-	-	-

(+) = 抗原 (赤色スポット) 陽性の指示

(-) = 抗原 (赤色スポット) 陰性の指示

【0059】

【発明の効果】本発明はアッセイを行うのに容易に使用できる物品および方法を提供するという点で有利である。この物品および方法は、トレーサーが物品に含まれるのでトレーサーの添加を必要としない。さらにこの物品および方法は迅速アッセイ法を提供しうる。

【0060】これらおよび他の利点はここに教示されるものから当業者には自明であろう。

【0061】以上の教示からみて本発明につき多数の改良および変法が可能であり、従って本発明は個々に記述されたもの以外の形態で実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の物品であるディップスティック10の略図であり、各記号は下記のものを表わす。

A: 第1部分 (トレーサーを含む)

B: 第2部分 (結合剤を含む)

C: 分離帯域

D: 第3部分 (測定部分)

【図1】

